

Zastosowania proteomiki w badaniach zaburzeń psychicznych

Marta Aleksejczuk

Koło Matematyczno-Przyrodnicze Studentów UJ

Zakład Biochemii Fizycznej

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

18martaal@gmail.com

Praca napisana pod opieką dr hab. Sylwii Kędrackiej-Krok, prof. UJ

Przez wiele lat jednym z głównych sposobów badania zaburzeń psychicznych były badania behawioralne na zwierzętach oraz obserwacje osób chorych. Jednak wraz z rozwojem nauki i technologii przed naukowcami, lekarzami oraz koncernami farmaceutycznymi otwierają się nowe drogi badań zaburzeń psychicznych. Jedną z coraz intensywniej eksplorowanych możliwości jest proteomika - dziedzina nauki zajmująca się globalną analizą wszystkich białek obecnych w danej próbce przy pomocy technik analitycznych takich jak spektrometria mas czy elektroforeza 2D. Obecnie techniki proteomiczne wykorzystywane są w szerokim spektrum badań na komórkach, tkankach zwierzęcych i ludzkich, prowadzone są również poszukiwania łatwo wykrywalnych markerów takich chorób jak schizofrenia czy depresja. Proteomiccy spotykają się jednak z szeregiem ograniczeń - od trudności z dostępem do materiałów badawczych po małą powtarzalność niektórych z używanych procedur.

Historia badań nad zaburzeniami psychicznymi

Narodziny psychofarmakoterapii możemy datować na pierwszą połowę XIX wieku. Wyizolowanie morfiny w 1806 r. oraz litu w 1817 r. zapoczątkowały próby leczenia nerwobóli oraz wybuchów agresji u pacjentów szpitali psychiatrycznych. W następnych dekadach wprowadzono kilka innych leków, jak bromek potasu na epilepsję i niepokój czy wodzian chlorału na bezsenność [1]. Warto zauważyć, że te pierwsze próby farmakoterapii miały miejsce jeszcze przed odkryciem ne-

uronalnej budowy mózgu (1873 r. - Camillio Golgi, 1887 r. - Ramón y Cajal), więc nie były one podparte żadną teorią na temat mechanizmów działania używanych leków. Nie oznacza to jednak, że ówcześni naukowcy nie podejmowali prób badania wpływu nowo zsyntetyzowanych związków na ludzki organizm. Opierały się one głównie na psychologicznych i fizjologicznych obserwacjach efektów podania różnych związków chemicznych, zarówno leków jak i rekreacyjnych używek osobom chorym oraz zdrowym. Warto wspomnieć tutaj prace Emile'a Kraepelin, który badał wpływ m. in. alkoholo-

lu, kofeiny, chloroformu i morfiny na psychikę zdrowych osób. Wprowadził wiele ulepszeń w metodzie naukowej badań psychofarmakoterapeutyków, takich jak zastosowanie kontroli placebo, automatyzacji pomiarów czasu odpowiedzi, a także podawanie różnych dawek leków i używek [2]. Badania nad podstawami zaburzeń psychicznych weszły na poziom molekularny wraz z kilkoma przełomowymi odkryciami. Pierwszym z nich było odkrycie chemicznej natury sygnałów przekazywanych w mózgu oraz identyfikacja pierwszego neurotransmitera – acetylocholiny. W latach 50. dokonany został kolejny przełom w psychofarmakologii – zsyntetyzowano efektywne leki przeciwpsychotyczne (m.in. chlorpromazyna) i przeciwdepresyjne (m.in. MAOI) [1]. Obydwa leki były początkowo testowane w innych celach – chlorpromazyna jako anestetyk a MAOI jako lek na gruźlicę. Do lat 50. leki były badane głównie na pacjentach lub na behawioralnych modelach zwierzęcych. Miało się to jednak wkrótce zmienić wraz z opanowaniem skutecznych metod hodowli komórkowych i wprowadzeniem linii komórkowej HeLa [3], a także opracowaniem pierwszego spektrofotofluorymetru. Nowa technologia umożliwiła mierzenie ilości monoamin i ich metabolitów w synapsach.

Kolejną dramatyczną zmianą w metodach badania chorób psychicznych był rozwój technik genetyki molekularnej. Opracowanie metody klonowania molekularnego pozwoliło neuronaukowcom przenieść uwagę z neurotransmiterów na wiążące się

z nimi białka – receptory. Rosnące zrozumienie ludzkiego genomu i relatywnie niskie koszty sekwencjonowania genomów rozpoczęło falę poszukiwań genetycznych markerów wielu chorób, w tym także psychicznych.

Wraz z tymi odkryciami dochodzimy do czasów współczesnych. Obecnie powszechna metoda ewaluacji zdrowia psychicznego pacjenta opiera się na protokołach opracowanych niemal pół wieku temu [4]. Jednym z największych problemów psychiatrii jest farmakologiczna heterogeniczność populacji czyli, innymi słowami, zjawisko różnej odpowiedzi/wrażliwości na te same leki u osób mających podobne objawy. Poszukiwane są różne ścieżki rozwiązania tego problemu, od zmiany sposobów diagnozy [5], przez próby zrozumienia mechanizmów stojących za zaburzeniami psychicznymi po poszukiwania ich biomarkerów. Jedną z coraz częściej implementowanych praktyk w tej sferze badań jest proteomika.

Wprowadzenie do proteomiki

Słowo proteom, od którego powstała następnie nazwa całej dziedziny badań, zostało wprowadzone w 1994 roku przez Marca Wilkinsa, twórcę pierwszego laboratorium proteomicznego. Proteom jest hybrydą dwóch słów: *protein* i *genome* (pol. białko i genom). Czym jest więc genom? Cytując T. A. Browna, autora „Genomów” – „Genom to całkowity DNA komórki, obejmujący zarówno wszystkie geny, jak i odcinki międzygenowe” [6]. Drogą dedukcji można wysnuć wniosek, że



Ryc.1.Działy proteomiki [7].

proteom to całkowity rezerwuuar białkowy komórki, a proteomika to gałąź nauki zajmująca się badaniem proteomów.

Tym co odróżnia proteomikę od klasycznych badań nad białkami są skala i metody. Proteomika nie zajmuje się badaniem struktur czy właściwości konkretnych białek, lecz ich obecności, ilości oraz ich oddziaływań między sobą w całej próbce. Próbką taka może być lizat komórek lub tkanki. Aby lepiej zrozumieć zastosowania proteomiki, możemy spojrzeć na jej działy, wyróżnione w „Proteomice” J. Silberinga i A. Kraj [7] - Ryc. 1.

Proteomika ilościowa zajmuje się badaniem dynamicznych zmian stężeń białek w komórce, zachodzących pod wpływem czynników zewnętrznych. Pozwala również na porównywanie stężeń różnych białek między sobą. Głównie wykorzystywaną w niej techniką jest spektrometria mas.

Proteomika strukturalna - jej celem jest ustalenie struktury przestrzennej wszystkich białek. Używa się w niej innych metod niż w pozostałych gałęziach proteomiki. Wykorzystuje się tu przede wszystkim techniki krystalograficzne oraz spektroskopię NMR.

Proteomika funkcjonalna - głównym polem zainteresowań proteomiki funkcjonalnej są układy reakcji biochemicznych. Do jej zadań należą m.in. identyfikacja i charakteryzacja białek uczestniczących w procesach biochemicznych, analiza oddziaływań białek z innymi biomolekułami oraz ze sobą nawzajem, a także badanie powiązań między szlakami reakcji metabolicznych. Proteomika funkcjonalna korzysta z m. in. mikromacierzy białkowych.

Proteomika kliniczna - w obrębie proteomiki klinicznej można wyróżnić trzy różne podejścia:

a) badanie ekspresji białek w danej tkance lub narządzie i określanie ich

modyfikacji potranslacyjnych,
b) porównywanie profili białkowych w stanie fizjologicznym organizmu i w czasie zmian patologicznych,
c) badanie oddziaływań białko-białko oraz białko-kwas nukleinowy.

Główny materiał badawczy w proteomice klinicznej stanowią płyny ustrojowe (np. krew, płyn mózgoworzeniowy) oraz próbki tkanek z biopsji.

Farmakoproteomika jest dziedziną nauki, która powstała z połączenia proteomiki i farmacji. Skupia się na identyfikacji białek związanych z chorobami, poznawaniu ich funkcji oraz znaczenia w szlakach metabolicznych. Koncentruje się na znalezieniu białek mogących być celami dla leków oraz sprawdzanie wpływu już istniejących leków na proteomy komórek.

Najważniejsze metody badawcze

W zależności od specyfiki eksperymentu, wykorzystywane metody badawcze mogą się drastycznie różnić. Uwzględniając jednak podstawową definicję proteomiki, mówiąc, że jest to globalna analiza białek, w tym artykule uważa skupiana będzie głównie na narzędziach pozwalających na identyfikację i analizę wielu białek w tym samym czasie. Najczęściej używanymi metodami tego typu są elektroforeza w żelu poliakrylamidowym oraz spektrometria mas.

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

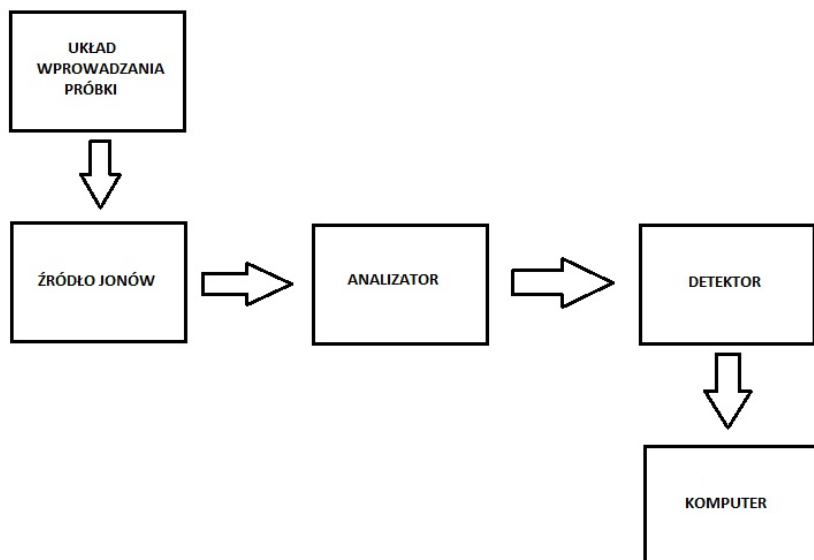
Elektroforeza to rozdział naładowanych cząsteczek (m.in. białek i pepty-

dów) pod wpływem działania przyłożonego pola elektrycznego. Na szybkość migracji cząsteczek mają wpływ takie czynniki jak masa cząsteczkowa i ładunek elektryczny. Najczęściej wykorzystywanymi w proteomice matrycami do elektroforezy są żele poliakrylamidowe. Przewyższają one żele agarozowe pod względem wytrzymałości mechanicznej i stabilności w szerokim zakresie pH oraz temperatury [7].

Białka są cząsteczkami amfoterycznymi, dlatego ich ładunek zależy od pH środowiska w jakim się znajdują. Jeśli pH buforu jest wyższe od punktu izoelektrycznego, pI danego białka będzie posiadało ładunek ujemny i migrowało w kierunku anody. Dystans jaki przebędzie dane białko zależy przede wszystkim od jego masy oraz rozmiaru porów.

Elektroforeza dwuwymiarowa w żelu poliakrylamidowym

Jest to odmiana elektroforezy białek składająca się z dwóch etapów. Pierwszym jest ogniskowanie izoelektryczne. Białka umieszczane są w żelu w gradiencie pH, gdzie pod wpływem przyłożonego napięcia elektrycznego, następuje ich migracja do miejsca, w którym ich pI zbliżone jest do pH. Kolejnym etapem jest elektroforeza zapewniająca rozdział ze względu na masę białek. W wyniku połączenia tych dwóch technik, uzyskuje się żel o większej rozdzielczości (zachodzi rozdział cząsteczek o nawet małej różnicy mas).



Ryc.2. Schemat działania spektroskopu mas.

Spektrometria mas

Istnieje wiele rodzajów spektrometrów mas, różniących się zarówno budową jak i przeznaczeniem, wszystkie jednak są urządzeniami służącymi do pomiaru m/z , czyli stosunku masy cząsteczki do jej ładunku. Pierwszym etapem pomiarów jest jonizacja cząsteczek. Jony, w przeciwieństwie do cząsteczek obojętnych, mogą poruszać się pod wpływem pola elektrycznego w próżni. Wiązka jonów jest następnie rozdzielana w analizatorze ze względu na wartość m/z . Jony są wprowadzone do detektora, w którym dochodzi do ich konwersji na prąd elektryczny rejestrowany przez komputer, gdzie następuje. Tam odpowiednie oprogramowanie zapisuje intensywność sygnałów elektrycznych i przedstawia wynik w postaci widma masowego [8].

Schemat działania spektroskopu mas

przedstawiono na Ryc. 2.

Spektrometria mas umożliwia uzyskanie informacji na temat składu aminokwasowego peptydów, modyfikacji potranslacyjnych cząsteczek oraz stężenia składników mieszaniny.

W następnej części artykułu zostaną omówione wady, zalety oraz możliwości różnych podejść badawczych i zastosowań proteomiki na przykładzie kilku eksperymentów.

Czy można badać mózg bez mózgu?

Opracowanie metod hodowania linii komórkowych, prace nad komórkami macierzystymi oraz odkrycie metody indukcji komórek zróżnicowanych z powrotem do stanu pluripotencjalnego umożliwiło prowadzenie badań nad liniami komórkowymi na niespotykaną

wcześniej skalę [3,9]. Gdy mówimy o badaniach nad zaburzeniami psychicznymi, badania nad liniami komórkowymi posiadają wiele wad w porównaniu z innymi metodami; przede wszystkim nie istnieją one w otoczeniu organizmu, dlatego nie dają pełnego poglądu na zachowanie komórek np. pod wpływem leków. Nie oznacza to jednak, że badania nad komórkami nie mogą stanowić cennego źródła wiedzy.

Przykładem zastosowania proteomiki w badaniach nad komórkami jest praca z zeszłego roku wydana w *International Journal of Molecular Sciences* pt. „*Proteomic Studies Reveal Disrupted in Schizophrenia 1 as a Player in Both Neurodevelopment and Synaptic Function*” [10].

W 1970 r., w Szkocji, grupa naukowców odkryła translokację w obrębie chromosomu 1, która prowadziła do zaburzenia funkcjonowania genu, nazwanego następnie *DISC1* [11]. Mutację tę powiązano wkrótce z szeroką paletą chorób psychicznych, od schizofreni, przez depresję, po zaburzenia zachowania [12]. Gen nazwano *DISC1* (disrupted in schizophrenia 1, zaburzony w schizofrenii 1), a produkowane przez nie białko *DISC1*. Nie znano jednak molekularnych efektów uszkodzenia genu stojących za zaburzeniami psychicznymi.

W wyżej wspomnianym badaniu zdecydowano się zbadać proteomy neuronów ze znokautowanym genem *DISC1* i porównać je z proteomami neuronów z funkcjonującym genem. W tym celu wykonano po 4 elektroforezy 2D w żelach dla każdego rodzaju komórek.

Odkryto różnice ekspresji 78 białek, z których 68 udało się zidentyfikować przy pomocy spektrometrii mas. Większość z nich okazała się związana z rozwojem neuronów oraz funkcją synaps. Stwierdzono udział tych białek w szlakach sygnałowych mających wpływ na różnicowanie się neuronów i wzrost aksonów [10].

Badania tego typu mogą pozwolić nie tylko na lepsze szacowanie ryzyka zapadnięcia na poważne choroby psychiczne, ale również wykrywanie nowych potencjalnych celów terapeutycznych. Proteomika pozwala spojrzeć na funkcjonowanie komórki w szerszym horyzoncie niż większość innych metod, co jest szczególnie ważne przy tak skomplikowanych chorobach jak np. schizofrenia.

Badania *post mortem*

Badania *post mortem* przedstawiają pewne zalety, niemożliwe do osiągnięcia przy zastosowaniu innych metod. Są one przeprowadzane na tkankach ludzkich, poddanych wszystkim czynnikom mogącym mieć wpływ na proteom komórek. Największymi ograniczeniami tego typu badań są mała dostępność materiału badawczego oraz zmiany zachodzące w czasie i po śmierci organizmu mogące zaburzać wyniki.

W pracy „*Comparative proteomic analysis with postmortem prefrontal cortex tissues of suicide victims versus controls*” [13] opisano wyniki analizy proteomicznej kory przedczołowej mózgu oraz płynu rdzeniowo-mózgowego osób zmarłych w wyniku samobójstwa,

z udekomentowaną historią różnych chorób psychicznych, w porównaniu do osób zmarłych z innych przyczyn. Ogółem pobrano próbki od 26 osób. Następnie wykonano elektroforezę 2D oraz spektrometrię mas.

W wynikach uzyskano trzy białka występujące jedynie w tkankach osób, które zmarły w wyniku samobójstwa, a trzy kolejne wykazywały znaczące różnice w ekspresji pomiędzy grupami. Wśród nich znaleziono m.in. białka regulujące ścieżki serotonergiczne w mózgu oraz chroniące przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Zaobserwowano zmiany w białku wchodzącym w interakcje z komórkami glejowymi, co może sugerować, że nie tylko komórki nerwowe zostają zmienione w toku chorób psychicznych.

Chociaż każdy uważny czytelnik poda w wątpliwość eksperyment uwzględniający próbki od jedynie 26 osób, badania jak to opisane wyżej przyczyniają się do rozwoju wiedzy na temat zaburzeń, z jednego ważnego powodu – badania *post mortem* są jedyną możliwością zbadania biochemicznego składu mózgów osób o których wiemy, że cierpieli na zaburzenia psychiczne. Ich wyniki mogą stanowić wskazówkę na co warto zwrócić uwagę w przyszłych badaniach.

Czy proteomika zmieni oblicze diagnostyki?

Poszukiwania obiektywnego sposobu diagnozy chorób psychicznych jest od dawna jednym ze złotych graali psychiatrii. Prowadzone są badania biorą-

ce pod uwagę techniki obrazowania mózgu [14], identyfikację cząsteczek mikroRNA we krwi [15] oraz oczywiście białek. Podstawowymi zasadami, które muszą zostać spełnione przez potencjalny test na jakąkolwiek chorobę są: badany materiał powinien być łatwy do pobrania, test powinien być jednoznaczny, a jego wykonanie możliwe w rozsądnym oknie czasowym.

W artykule „*Development of a blood-based molecular biomarker test for identification of schizophrenia before disease onset*” opisano przeprowadzone na szeroką skalę poszukiwanie biomarkerów schizofrenii obecnych w krwi. Stworzony test oparto na zidentyfikowanych we wcześniejszym badaniu białkach, których poziom ekspresji był zmieniony u osób cierpiących na schizofrenię [16]. Przygotowano multipleksowy test immunologiczny pozwalający na zmierzenie stężenia 225 analitów związanych z procesami zapalnymi, immunologicznymi, hormonalnymi, metabolicznymi oraz neurotroficznymi.

W badaniu wzięto pod uwagę próbki krwi od 957 osób. W pierwszej części eksperymentu zidentyfikowano 29 analitów, które były znacząco różne pomiędzy grupą osób doświadczających pierwszego epizodu schizofrenii, w porównaniu z kontrolą osób chorych. Dokonano porównania wyników z dwiema grupami pacjentów z Europy, a następnie z grupą osób chorych na chorobę dwubiegunową.

Wykazano, że test z dużą celnością rozpoznaje osoby chore na schizofrenię, a także przewiduje, u których osób wykazujących wczesne objawy rozwi-

nie się choroba. Rozróżniał on także osoby z chorobą dwubiegunową od osób ze schizofrenią.

Poszukiwania białkowych biomarkerów chorób psychicznych zwiastują nową erę diagnostyki tych chorób. Podobne badania mogą również nauczyć nas wiele o efektach chorób psychicznych na cały organizm.

Podsumowanie

W powyższym artykule omówiono historię badań nad zaburzeniami psychicznymi i nakreślono jak metody proteomiczne przyczyniają się do dalszego rozwoju wiedzy na ten temat. Proteomika umożliwia uzyskanie bardziej globalnej wiedzy na temat procesów komórkowych zachodzących na poziomie molekularnym, co jest wyjątkowo przydatne w tak skomplikowanych schorzeniach jak choroby psychiczne. Modyfikacje potranslacyjne białek sprawiają, że liczba tych molekuł w komórce jest znacznie większa niż wynikałoby to z liczby genów kodujących białka. W związku z tym posługiwanie się wyłącznie metodami genetycznymi nie przyniesie pełnego zrozumienia fizjologicznych i patologicznych procesów zachodzących w ludzkim organizmie. Jeśli przyszłe badania nad chorobami uwarunkowanymi środowiskowo, a nie wyłącznie dziedzicznymi mają być pełne, wykorzystanie metod proteomicznych będzie niezbędnym uzupełnieniem badań genetycznych.

Bibliografia

- [1] Ban TA. PHARMACOTHERAPY OF MENTAL ILLNESS - A HISTORICAL ANALYSIS. :19.
- [2] Müller U, Fletcher PC, Steinberg H. The origin of pharmacopsychology: Emil Kraepelin's experiments in Leipzig, Dorpat and Heidelberg (1882-1892). *Psychopharmacology (Berl)*. 2006;184(2):131-138. doi:10.1007/s00213-005-0239-5
- [3] Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):315-319. doi:10.1038/nrc775
- [4] Rubin EH, Zorumski CF. Perspective: Upcoming Paradigm Shifts for Psychiatry in Clinical Care, Research, and Education. *Acad Med*. 2012;87(3):261. doi:10.1097/ACM.0b013e3182441697
- [5] Ban TA. Towards a clinical methodology for neuropsychopharmacological research. *Neuropsychopharmacol Hung Magy Pszichofarmakologiai Egyesulet Lapja Off J Hung Assoc Psychopharmacol*. 2007;9(2):81-90.
- [6] Brown T. Genomy.
- [7] Silberring J, Kraj A. Proteomika. *Wydział Chemii UJ*; 2004.
- [8] Silberring J, Suder P, Bodzoń A. *Spektrometria Mas*. Kraków: Wydawnictwo AGH; 2016.
- [9] Zuccoli GS, Martins-de-Souza D, Guest PC, Rehen SK, Nascimento JM. Combining Patient-Reprogrammed Neural Cells and Proteomics as a Model to Study Psychiatric Disorders. In: Guest PC, ed. *Proteomic Methods in Neuropsychiatric Research*. Vol 974. Cham: Springer International Publishing; 2017:279-287. doi:10.1007/978-3-319-52479-5_26
- [10] Ramos A, Rodríguez-Seoane C, Rosa I, et al. Proteomic Studies Reveal Disrupted in Schizophrenia 1 as a Player in Both Neurodevelopment and Synaptic Function. *Int J Mol Sci*. 2018;20(1):119. doi:10.3390/ijms20010119
- [11] Reference GH. DISC1 gene. *Genetics Home Reference*. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/DISC1>.

Accessed April 14, 2019.

[12] Blackwood DHR, Fordyce A, Walker MT, St. Clair DM, Porteous DJ, Muir WJ. Schizophrenia and Affective Disorders—Cosegregation with a Translocation at Chromosome 1q42 That Directly Disrupts Brain-Expressed Genes: Clinical and P300 Findings in a Family. *Am J Hum Genet.* 2001;69(2):428-433.

[13] Schlicht K, Büttner A, Siedler F, et al. Comparative proteomic analysis with postmortem prefrontal cortex tissues of suicide victims versus controls. *J Psychiatr Res.* 2007;41(6):493-501. doi:10.1016/j.jpsychires.2006.04.006

[14] Zarogianni E, Moorhead TWJ, Lawrie SM. Towards the identification of imaging biomarkers in schizophrenia, using multivariate pattern classification at a single-subject level. *Neuro-Image Clin.* 2013;3:279-289. doi:10.1016/j.nicl.2013.09.003

[15] Shi W, Du J, Qi Y, et al. Aberrant expression of serum miRNAs in schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2012;46(2):198-204. doi:10.1016/j.jpsychires.2011.09.010

[16] Schwarz E, Guest PC, Rahmoune H, et al. Identification of a biological signature for schizophrenia in serum. *Mol Psychiatry.* 2012;17(5):494-502. doi:10.1038/mp.2011.42